

**Kinetik der zellbedingten Immunantwort
gegen methylcholanthren-induzierte
Fibrosarkome bei Mäusen**

Vorgelegt

von

Kurt Meißner

aus

Erlangen

1977 P 399



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548423_0034

INSTITUT UND POLIKLINIK FÜR KLINISCHE IMMUNOLOGIE DER UNIVERSITÄT
ERLANGEN - NÜRNBERG

Vorstand: Professor Dr. med. F. Scheiffarth

KINETIK DER ZELLBEDINGTEN IMMUNANTWORT GEGEN METHYLCHOLANTHREN-INDUZIERT
FIBROSARKOME BEI MÄUSEN

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
dem
FACHBEREICH MEDIZIN
der
FRIEDRICH-ALEXANDER-UNIVERSITÄT
zu
ERLANGEN - NÜRNBERG

vorgelegt von
Kurt Meißner
aus Erlangen

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan : Prof. Dr. E. Rügheimer

Referent : Prof. Dr. F. Scheiffarth

Tag der mündlichen Prüfung : 26. Mai 1977

Über die durch Lymphozyten vermittelte Zytotoxizität gegenüber Tumor-Target-Zellen wurde in den letzten Jahren intensiv geforscht. Es hat sich als sicher herausgestellt, daß Lymphozyten, die zytotoxisch gegenüber Tumorzellen sind, im Blut und in den lymphatischen Organen von tumortragenden Tieren erscheinen, und daß Serumfaktoren existieren, welche die tumorspezifische Wirkung aufheben oder vergrößern können (16, 34). Makrophagen spielen offensichtlich eine bedeutende Rolle im Abwehrmechanismus. So hat es sich gezeigt, daß speziell aktivierte Makrophagen das Wachstum von Tumorzellen *in vitro* unterdrücken (5, 9, 13, 21, 25, 32); aber auch die gegensätzliche Wirkung wurde für die sogenannten Suppressor - Makrophagen beschrieben (23). Aus diesen Arbeiten geht klar hervor, daß die zellvermittelte Zytotoxizität ein komplexer Mechanismus ist, bei dem die Wirkungen der T-Zell-abhängigen Zytotoxizität, der nicht T-Zell-abhängigen durch Antikörper vermittelten Zytotoxizität und die Wirkungen, die durch die Makrophagen hervorgerufen werden, sich untereinander überlagern.

Wenige grundlegende Erkenntnisse gibt es über die Signifikanz der verschiedenen Reaktionen *in vivo*. Ebenso vereinzelt sind die Arbeiten, die sich mit der Wechselbeziehung zwischen der durch Lymphozyten vermittelten Zytotoxizität und der *in vivo* - Phase der Immunisierung beschäftigen. Die Ergebnisse der Versuche sind zudem widersprüchlich. In einigen dieser Arbeiten äußerte sich die Zyto-

toxizität entsprechend dem Tumorstadium des Wirtes: In Tieren mit rückgebildeten Tumoren und in Tieren nach Tumorentfernung war eine durch Lymphozyten vermittelte Zytotoxizität feststellbar, während in Tieren mit fortschreitendem Tumorwachstum zytotoxische Lymphozyten nicht gefunden werden konnten(4, 19). Jedoch erwies sich bei einem von einem Gross Virus induzierten Tumor die Lymphozytotoxizität als vermindert, wenn der Tumor wuchs (8, 9); sie blieb aber selbst in Mäusen mit zurückgebildetem Tumor auf niedrigem Niveau. Partielles Wiedereinsetzen der Zytotoxizität wurde dann beobachtet, wenn die Lymphozyten für 12 Stunden mit Medium inkubiert waren (20). Folglich unterscheiden sich die in vitro Ergebnisse der durch Lymphozyten vermittelten Zytotoxizität in tumortragenden Tieren in Abhängigkeit von den Tumorzellen, dem Versuchssystem oder der Lymphozytenpopulation, die in der Arbeit verwendet wurden, beträchtlich.

In der vorliegenden Arbeit wurde die in vitro bestimmte Zytotoxizität von Lymphozyten aus tumortragenden und tumorfreien Mäusen, beziehungsweise immunisierten und nicht immunisierten Mäusen mit dem Tumorwachstum in vivo verglichen. Als Tumor verwendeten wir transplantierbare Mäuse-MCAF-Zellen.

Die Lymphozytotoxizität wie auch die Zytotoxizität der adhärenenten Zellen zeigte eine reproduzierbare zeitliche Beziehung zum Tumorwachstum. In gegen den Tumor sensibilisierten Mäusen verzögerte sich das Tumorwachstum signifikant oder die Tumoren bildeten sich vollständig zurück. Auch hier war die in vitro-Zytotoxizität vom

Stadium der Tumorentwicklung abhängig. Serum erhöhte die Zytotoxizität der adhärenen Zellen, hatte aber geringeren Einfluß auf die T-zell-abhängige Target-Zellen-Lysis.

Material und Methoden

Mäuse:

Zur Verwendung kamen nur weibliche C57Bl6 Mäuse im Alter von 6 - 10 Wochen. Sie stammten aus der eigenen Zucht eines streng syngenesischen Stammes.

Tumor:

1 mg Methylcholanthren (MCA) in 0,5 ml Sesamöl wurden subcutan in die Flanke von C57Bl6 Mäusen injiziert. Nach 2 - 4 Monaten entwickelten sich Tumoren. Histologisch waren es Fibrosarkome. Die zerkleinerten Tumorteile wurden in eine 0,25 %ige Kollagenase-Lösung (Serva-Feinchemie, Heidelberg) gegeben und 30 min bei 37°C auf einem Schaukelapparat geschüttelt. Die getrennten Zellen wurden bei 1000 rpm 10 min abzentrifugiert und in RPMI 1640 Medium gegeben. 5×10^5 Zellen wurden in die Flanke unbehandelter Mäuse transplantiert. Nach 7 - 10 Tagen entwickelten sich kleine Tumoren, die in den folgenden 4 Wochen ein Gewicht bis zu 7 g erreichten. Die Tiere erlagen nach 5 - 7 Wochen dem Tumor. Alle in diesen Versuchen verwendeten Tumorzellen stammten aus ein und demselben Primärtumor.

Immunisierung der Mäuse:

Zur Immunisierung der Mäuse wurden MCAF-Zellen durch die oben beschriebene Kollagenase - Behandlung aus frisch präparierten 3 - 4 Wochen alten Mäusen gewonnen und 30 min bei 56°C inkubiert. Die Immunisierung der Mäuse erfolgte durch eine Injektion in die vier Fußsohlen von 10^6 durch Hitze abgetöteten MCAF-Zellen, aufgeschwemmt

in 0,1 ml vollständigem Freund'schem Adjuvans (Difco Lab., Detroit Michigan USA). 3 x wurde in wöchentlichen Abständen die gleiche Injektion mit 10^6 MCAF-Zellen intraperitoneal wiederholt. Nach 5 Wochen wurden 5×10^4 lebende MCAF-Zellen in die immunisierten Mäuse transplantiert. Nicht immunisierte Mäuse wurden zur Kontrolle ebenso behandelt.

Serumgewinnung:

Die Seren wurden aus demselben Tier zur gleichen Zeit wie die Effektor-Zellen gewonnen. 0.5 - 1 ml Blut wurden aus dem Plexus orbitalis der Mäuse entnommen. Durch Spontangerinnung erhielten wir die Seren. Der zytotoxische Titer des Antiserums gegen MCAF-Zellen in den immunisierten Mäusen vor der Tumortransplantation betrug 1 : 512 im Trypanblau-Ausschlußtest (Inkubation von 10^5 MCAF-Zellen mit 0,1 ml Antiserum-Lösung und 0.2 ml 1 : 10 verdünnten Kaninchenserum als Komplement bei 37° C für 60 min, anschließend Zählen der toten Zellen nach Zugabe von 0.25 %iger Trypanblau-Lösung).

Targetzellkulturen:

MCAF-Zellen erhielten wir 3 Wochen nach Transplantation des Tumors aus tumortragenden Mäusen. Die Tumoren wurden entnommen, mit der Schere zerstückelt und die Zellen durch Behandlung mit 0.25 %iger Kollagenase-Lösung isoliert. Zwischen 0.5 und 1×10^6 Zellen wurden in 20 ml RPMI 1640 Medium mit 10 %igem fetalem Kälberserum in 250 ml Flaschen (Falcon Plastics, Calif.) gezüchtet. Nach 2 - 3 Kulturpassagen bestanden die Kulturen aus einheitlich aussehenden Zellen,

die in Monolayern am Boden haftend wuchsen. Die Zellen wurden durch Trypsinisierung mit 0.25 %iger Trypsinlösung abgelöst. Die Generationszeit der Zellen lag bei 24 - 48 Stunden. Als Kontrollzellen wurden in erwachsenen C57Bl6 Mäusen gezüchtete Fibroblasten verwendet.

Gewinnung der Effektor-Zellen:

Lymphozyten für den zytotoxischen Versuch wurden von immunisierten und nicht immunisierten C57Bl6 Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Tumortransplantation gewonnen. 3, 7, 14, 21, 28 und 35 Tage nach Transplantation von 5×10^5 MCAF-Zellen wurden die tumortragenden Tiere getötet. Die Tumoren wurden entnommen und gewogen. Tumorfremie Mäuse wurden als Kontrolle verwendet. Zellen aus dem Peritonealexsudat wurden zur Gewinnung von adhärenz Zellen entnommen. Aus denselben Tieren wurden Lymphknoten und Milzen zur Gewinnung von unfractionierten Lymphozyten und T-Zellen gesammelt.

Milzen und Lymphknoten der Mäuse wurden entfernt und die Lymphozyten durch Auszupfen mit der Pinzette von den Organen isoliert. Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium gegeben, das mit Glutamin, Natrium-pyruvat und einer Mischung aus nichtessentiellen Aminosäuren vervollständigt war. Diese Zellen wurden als unfractionierte Lymphozyten verwendet. Zur Abtrennung der T-Zellen wurden die Lymphozyten durch eine Nylonwolle-Säule von 5 cm Länge und 1.2 cm Durchmesser, gemäß der Methode von Julius et al. (22), geschickt. Die passierenden Zellen wurden mit vollständigem RPMI 1640 Medium, das 2.5 %iges fetales Kälberserum enthielt, aus der Nylonwolle gewaschen. Die Zellen der C57Bl6 Mäuse wurden auf T-Lymphozyten durch den Prozentsatz der Zy-

tolyse nach Inkubation mit Anti- θ -Serum und Komplement getestet. 10^7 Lymphozyten in RPMI 1640 Medium wurden mit 0.1 ml eines 1 : 100 verdünnten Anti- θ -Serums (zytotoxischer Titer 1:125000) und 0.5 ml 1 : 10 verdünnten Meerschweinchenserums als Komplement für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Der Prozentsatz der toten Zellen wurde mit einem Trypanblau-Ausschlußtest bestimmt, wobei mehr als 95 % der Zellen die Nylonwolle-Säule passiert hatten.

Haftende Zellen wurden aus Peritonealexsudat-Zellen derselben Mäuse gewonnen. 7 ml Hanks-Lösung wurde in das Peritoneum der getöteten Mäuse eingespritzt. Nach 15 min, bei gelegentlichem vorsichtigen Drücken des Abdomens, wurde die Flüssigkeit abgesaugt und die Zellen bei 1000 rpm für 10 min abzentrifugiert und gezählt. 2×10^5 oder 2×10^6 Zellen wurden in die Vertiefungen einer Linbro-Platte Nr. FB 16-24 TC (Linbro Chemicals Co. Inc, New Haven, Conn.) 30 min inkubiert. Danach wurden die Vertiefungen mit RPMI 1640 Medium wiederholt ausgewaschen und die haftenden Zellen an typischen Stellen der Vertiefungen ausgezählt mit dem Ergebnis, daß 50 - 60 % der eingegebenen Zellen am Boden der Vertiefungen hafteten.

Mikrozytotoxizitäts-Test:

Der Test wurde gemäß einer Modifikation der Technik, die Cohen et al. (6) beschrieben haben, durchgeführt. Als Target-Zellen wurden MCAF-Zellen und Fibroblasten aus C57Bl6 Mäusen verwendet. Zellkulturen (1×10^6 Zellen) wurden mit 50 μCi ^{125}I -Jododeoxyuridine (New England Nuclear, Boston Mass.) für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Medium abgossen und die Zellen dreimal mit

RPMI 1640 Medium gewaschen. Die Zellen wurden trypsinisiert und gezählt. Für den Zytotoxizitäts-Test wurden Zellen nur dann verwendet, wenn zwischen 5000 und 15000 cpm pro 20.000 Zellen im Gamma-Zähler (Nuclear Data Selectronic System, Schaumburg, Ill.) gezählt worden waren. 20.000 markierte Target-Zellen wurden in jede der Vertiefungen der Linbro-Platten Nr. FB 16-24 TC eingebracht. Nach einer Inkubation von 3 - 4 Stunden bei 37° C hafteten die Zellen. Das Medium der Platten wurde abgegossen und die Target-Zellen in den Platten mit Lymphozyten inkubiert. Die Target-Zellen wurden nach Einbringung der adherenten Zellen in die Vertiefungen gegeben. Die Effektor-Zellen wurden den Target-Zellen im Verhältnis 10 : 1 bzw 100 : 1 zugegeben. Bei den Versuchen, in denen die Wirkung der Serumfaktoren der Immunsereen auf die zellvermittelte Zytotoxizität geprüft wurde, waren die Target-Zellen mit 0,1 ml Antiserum pro 20.000 Zellen für 30 min bei 37° C vorbebrütet und danach gewaschen worden.

Die Linbro-Platten wurden 24 Stunden in einem begasten Inkubator bebrütet. Der Überstand wurde abgesaugt und die Radioaktivität (cpm), die von den markierten Target-Zellen ins Medium übergetreten war, im Gamma-Zähler gezählt. Die spontane Freisetzung der Radioaktivität (cpm spontane Freisetzung) wurde für jede Target-Zellgruppe getrennt bestimmt. Der maximale Einbau von ¹²⁵J in die Target-Zellen (cpm max) wurde nach der Zerstörung der Target-Zellen durch 1 n Kaliumhydroxyd gemessen.

Die Berechnung der spezifischen Zellzerstörung in % erfolgte nach folgender Formel:

$$\% \text{ spezif. Lysis} = \frac{\text{cpm Lymphoz. aus Tumormäusen} - \text{cpm Ly aus Kontrollm.}}{\text{cpm max} - \text{cpm spont. Freisetzung}} \times 100$$

Die Mittelwerte und die Standardabweichung der jeweils vierfach durchgeführten Tests wurde berechnet. Nur die Versuche sind durchgeführt, bei denen die Standardabweichung der spezifischen Lysis in Prozent weniger als 5 % betrug. Alle Versuche sind wenigstens fünfmal durchgeführt worden.

Ergebnisse

Die Tumore wuchsen progredient in allen nicht immunisierten Tieren nach Transplantation von 5×10^5 MCAF-Zellen. Nach 40 Tagen waren mehr als 50 % der behandelten Tiere am Tumor gestorben (Fig.1:).

Die Ergebnisse der zytotoxischen Tests sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die % spezifische Lysis wurde für nicht aufgetrennte Lymphozyten, T-Zellen und adhärenente Zellen von tumortragenden und nicht tumortragenden Mäusen als Effektor-Zellen und für Fibrosarkom-Zellen als Target-Zellen berechnet.

Unfraktionierte Lymphozyten und T-Zellen waren 7 - 14 Tage nach der Tumortransplantation hoch zytotoxisch. Eine signifikante Zytotoxizität von Lymphozyten aus tumortragenden Mäusen im Vergleich zu Lymphozyten aus tumorfreien Mäusen konnte jedoch nach drei bis fünf Wochen nicht gezeigt werden. Grundsätzlich gleiche Ergebnisse waren bei den adhärenenten Zellen zu sehen, jedoch zeigten die Zellen von tumorfreien Mäusen in diesen Versuchen eine hohe spontane Zytotoxizität (ungefähr 40 - 50 % des cpm_{max}). Die Gegenwart des Serums, das von tumortragenden und tumorfreien Mäusen zur gleichen Zeit wie die Effektor-Zellen gewonnen wurde, zeigte keine signifikante Änderung der Zytotoxizität von unfraktionierten Lymphozyten oder T-Zellen (Tab.2:). Die Zytotoxizität der adhärenenten Zellen war jedoch über die ganze Beobachtungszeit signifikant erhöht.

In den durch Injektion von Tumor-Zellen und Freund'schen Adjuvans vorimmunisierten Mäusen wurde eine Retardierung des Tumorwachstums beobachtet (Fig.1:). In den nicht sensibilisierten Mäusen hingegen

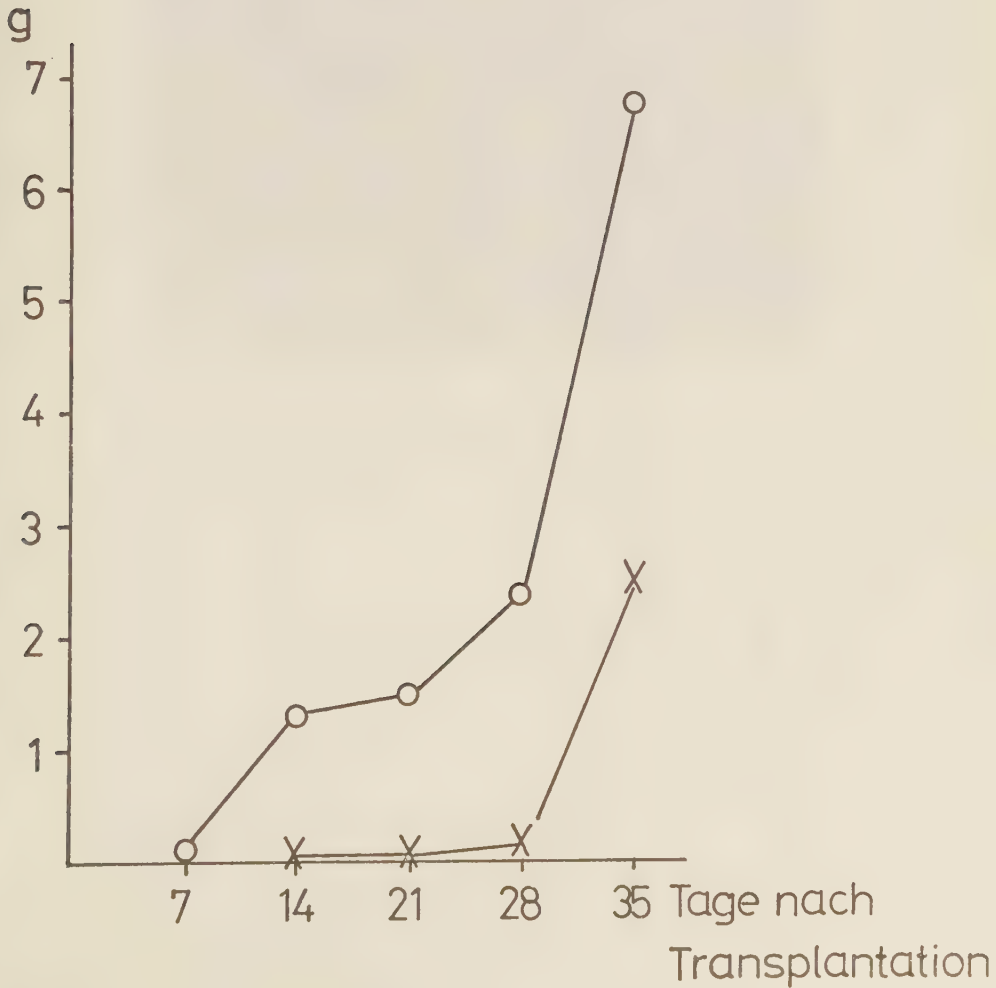
wuchs der Tumor vom 7. Tag nach Transplantation stetig. In den immunisierten Tieren wurde er nicht vor dem 21. Tage beobachtet. Bei 6 von 20 Tieren, die länger als 35 Tage nach der Tumortransplantation beobachtet wurden, trat eine deutliche Tumorregression auf. Bei den übrigen wuchs der Tumor nach dem 28. Tag progredient.

Wenn man die Lymphozytotoxizität der immunisierten Mäuse und der nicht immunisierten Mäuse als Kontrolle verglich, errechnete sich eine Prozent-spezifische Lysis von mehr als 20 % für unfractionierte Lymphozyten und adhärenzte Zellen. Die T-Zell-abhängige Zytotoxizität betrug 14.6 % spezifische Lysis. In Tabelle 3 wird die spezifische Lysis von immunisierten tumortragenden Mäusen im Vergleich zu nicht immunisierten tumortragenden Mäusen als Kontrolle gezeigt. Die immunisierten Mäuse zeigten eine hohe Zytotoxizität für alle Effektor-Zellpopulationen der Untersuchung während 4 Wochen nach Transplantation.

Danach nahm die Zytotoxizität in den Tieren mit Tumorprogression ab; eine spezifische Lysis konnte bei den immunisierten Mäusen nicht gezeigt werden. Aber auch in den Tieren mit Tumorregression war die Zytotoxizität aller Effektor-Zellpopulationen während der Untersuchung signifikant ungleich, wenn man sie mit den Ergebnisse vor oder unmittelbar nach der Tumortransplantation vergleicht.

Das Serum der immunisierten Tiere hatte wenig Einfluß auf die Zytotoxizität in den ersten drei Wochen nach Tumortransplantation (Tab.4:). Danach nahm die Zytotoxizität der unfractionierten Lymphozyten und der adhärenzten Zellen durch das Serum zu, das aus denselben Tieren zur gleichen Zeit wie die Effektor-Zellen entnommen worden war. Die T-Zellen-abhängige Zytotoxizität änderte sich durch Zugabe von Serum nicht.

Abb. 1: Gewicht der MCA - Fibrosarkome in immunisierten Mäusen (X) und in nicht immunisierten Mäusen (O).



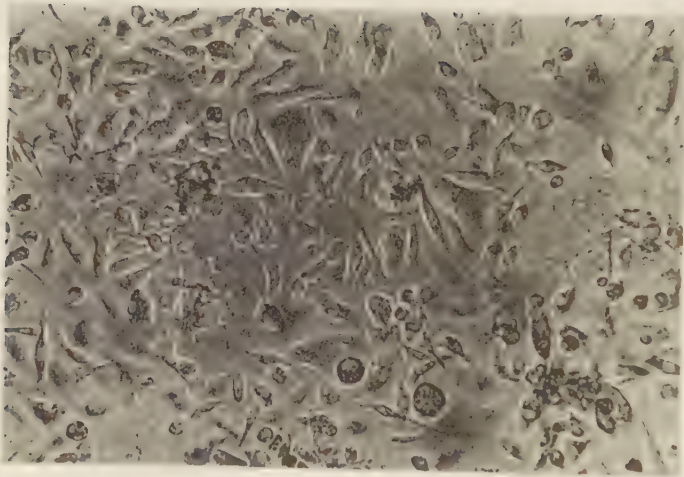


Abb. 2: Fibrosarkomzellen in Gewebekultur.

Zeit*	Prozent spezifische Lysis ⁺			adhärente Zellen
	unfrakt. Lymphozyten	T-Zellen		
3 Tage nach Transplantation	7.3 ± 3.71	5.5 ± 2.94		2.5 ± 1.94
7 "	22.3 ± 8.25	26.2 ± 7.32		14.1 ± 8.23
14 "	37.6 ± 12.41	21.4 ± 4.29		12.9 ± 5.47
21 "	6.0 ± 1.89	7.6 ± 2.31		0.4 ± 1.26
28 "	9.7 ± 3.38	12.0 ± 4.01		3.1 ± 1.48
35 "	0.5 ± 1.62	1.5 ± 1.27		0.2 ± 0.89

* Zeitpunkt der Gewinnung der Effektorzellen und des Serums nach Transplantation von 10⁵ MCAF-Zellen.

+ Die prozentspezifische Lysis bei einem Verhältnis EZ/TZ von 100:1 wurde wie folgt berechnet:

$$\%SL = \frac{\text{cpm (Lymphozyten aus Tumormäusen)} - \text{cpm (Lymphozyten der Kontrollmäuse)}}{\text{cpm max} - \text{cpm spontane Freisetzung}} \times 100$$

Tab. 1: Zytotoxizität der Effektorzellen aus tumortragenden Mäusen gegenüber MCAF-Zellen im Vergleich zur Zytotoxizität bei nicht tumortragenden Mäusen.

Zeit*	Prozent spezifische Lysis		
	unfraktionierte Lymphozyten	T-Zellen	adhärente Zellen
3 Tage nach Transpl.	7.4 ± 2.31	1.8 ± 0.29	0.2 ± 1.20
7 "	22.1 ± 4.44	20.6 ± 6.48	39.8 ± 9.72
14 "	28.4 ± 8.29	15.1 ± 3.92	24.6 ± 5.44
21 "	15.6 ± 6.31	9.6 ± 1.31	20.4 ± 2.89
28 "	3.0 ± 2.11	9.8 ± 2.49	10.8 ± 1.24
35 "	0 ± 1.04	1.6 ± 1.08	10.9 ± 3.29

* Zeitpunkt der Gewinnung der Effektorzellen und des Serums nach Transplantation von 10^5 MDAF-Zellen.

+ Die Prozentspezifische Lysis bei einem Verhältnis EZ/TZ von 100:1 wurde wie folgt berechnet:

$$\%SL = \frac{\text{cpm Lymphozyten aus Tumormäusen} + \text{Serum}) - \text{cpm (Lymphozyten von Kontrollmäusen} + \text{Serum})}{\text{cpm max} - \text{cpm spontane Freisetzung}} \times 100$$

Mittelwerte und Standardabweichung von 7 Versuchen, von denen jeder 4-fach ausgeführt wurde, sind aufgeführt.

Tab. 2: Zytotoxizität von Effektorzellen aus tumortragenden Mäusen gegenüber MDAF-Zellen in Gegenwart von Serum im Vergleich zur Zytotoxizität bei nicht tumortragenden Mäusen.

Zeit*	Prozent spezifische Lysis ⁺	
	unfraktionierte Lymphozyten	T-Zellen adhärente Zellen
vor Transplantation		
3 Tage nach Transplant.	24.7 ± 6.81	14.6 ± 2.41
7 "	19.6 ± 5.29	10.7 ± 4.29
14 "	15.4 ± 5.29	10.2 ± 3.31
21 "	18.6 ± 5.41	12.9 ± 4.09
28 "	18.2 ± 3.29	8.6 ± 2.76
35 "	22.0 ± 5.22	8.4 ± 2.04
35 " ++	0.1 ± 0.94	1.6 ± 1.01
35 " +++	6.7 ± 4.26	3.4 ± 1.21

* Zeitpunkt der Gewinnung der Effektorzellen nach Transplantation von 10⁵ MCAF-Zellen.

+ Die prozentspezifische Lysis bei einem Verhältnis EZ/TZ von 100:1 wurde wie folgt berechnet:

$$\%SL = \frac{\text{cpm (Lymphozyten von immunisierten Tumormäusen)}}{\text{cpm max} - \text{cpm spontane Freisetzung}} - \text{cpm (Lymphozyten von nicht immunisierten Tumormäusen)} \times 100$$

Mittelwerte und Standardabweichung von 7 Versuchen, von denen jeder 4-fach ausgeführt wurde, sind aufgeführt.

++ Mäuse mit progredientem Tumorwachstum

+++ Mäuse mit Tumorregression

Tab. 3: Zytotoxizität der Effektor-zellen aus immunisierten tumortragenden Mäusen gegenüber MCAF-Zellen im Vergleich zur Zytotoxizität bei nicht immunisierten tumortragenden Mäusen.

Zeit*	Prozent spezifische Lysis ⁺		
	unfraktion. Lymphozyten	T-Zellen	adhärente Zellen
vor Transplantation	27.1 ± 6.21	14.4 ± 4.24	34.1 ± 7.49
7 Tage nach Transplan.	22.4 ± 9.14	11.8 ± 3.43	42.5 ± 10.25
21 "	22.4 ± 5.97	7.6 ± 2.18	28.6 ± 7.22
28 "	26.0 ± 4.41	4.4 ± 1.73	21.4 ± 5.14
35 " ++	6.4 ± 2.79	0.4 ± 1.22	11.0 ± 4.79

* Zeitpunkt der Gewinnung der Effektorzellen und des Serums nach Transplantation von 10⁵ MCAF-Zellen.

⁺Die Prozentspezifische Lysis bei einem Verhältnis EZ/TZ von 100:1 wurde wie folgt berechnet:

$$\%SL = \frac{\text{cpm (Lymphozyten aus Tumormäusen)} - \text{cpm (Lymphozyten der Kontrollmäuse)}}{\text{cpm max} - \text{cpm spontane Freisetzung}} \times 100$$

Mittelwerte und Standardabweichung von 7 Versuche, von denen jeder 4-fach ausgeführt wurde, sind aufgeführt.

++ Mäuse mit progredientem Tumorstadium.

Tab. 4: Zytotoxizität der Effektorzellen aus immunisierten tumortragenden Mäusen gegenüber MCAF-Zellen in der Gegenwart von Serum im Vergleich zur Zytotoxizität bei nicht immunisierten tumortragenden Mäusen.

Diskussion:

Immunität gegenüber durch MCA induzierten Tumoren ist wiederholt in vorimmunisierten und nicht vorimmunisierten tumortragenden Tieren gezeigt worden (1, 2, 3, 12, 15, 18, 24, 30, 36). Nach Immunisierung sind die Tiere in der Lage, die durch MCA induzierten Tumore abzuwehren. Begleitende Immunität ist in Tieren mit wachsenden durch MCA induzierten Tumoren beobachtet worden. Aus der Literatur ist bekannt, daß in tumortragenden Mäusen bereits 7 Tage nach Tumortransplantation spezifische Immunreaktionen in vitro nachgewiesen werden können (4, 33). In diesen Versuchen wird die hauptsächlichliche zytotoxische Wirkung offensichtlich durch die T-Zellen vermittelt. Eine Antikörper-abhängige Zytotoxizität gegenüber durch MCA induzierten Tumoren durch normale Lymphozyten ohne T-Zellen ist bislang nicht gefunden worden. Makrophagen scheinen eine wichtige Rolle bei den Abwehrmechanismen zu spielen. Phagozytose von Tumorzellen, welche durch chemische Carcinogene induziert sind, ist ein gut belegtes Phänomen (5, 6). Zytophile Antikörper, die im Serum tumortragender Mäuse vorkommen können, rufen Makrophagen mit spezifischer Zytotoxizität hervor (8, 31). Die in vivo Aktivität der Makrophagen konnte jedoch nicht eindeutig bewiesen werden.

Eine Beziehung zwischen Tumorstadium in vivo und den in vitro gezeigten Immunreaktionen ist gefordert worden. Aber Unterschiede zwischen den in vitro gezeigten zellvermittelten Immunreaktionen und den in vivo Wirkungen wurden wiederholt entdeckt. Es wurde be-

hauptet, daß diese Unterschiede in der mit der Zeit sich ändernden Immunität gegenüber dem Tumor liegen. Über durch MCA hervorgerufene Tumore existieren keine relevanten Verlaufsstudien der in vitro aufgezeigten Immunreaktionen während des Tumorwachstums. Es gibt Arbeiten, die sich mit diesem Problem bei durch Viren induzierten Tumoren befassen. Die Ergebnisse dieser Versuche sagen aus, daß die Tumorummunität von ziemlich komplexen und komplizierten Mechanismen abhängt. Zum Beispiel haben ⁵¹Cr-Freisetzungsversuche das Auftreten von tumorspezifischen zytotoxischen Lymphozyten in Ratten gezeigt, die mit durch Gross Viren induzierten Lymphomen beimpft worden waren. Wenn die Tumoren wuchsen, wurde die Zytotoxizität schwächer und blieb sogar in Tieren mit rückgebildeten Tumoren auf niedrigem Niveau (20, 29).

Die durch den Moloney-Sarkom-Virus induzierten Tumoren bilden sich oft infolge immunologischer Mechanismen zurück. Testet man die zellvermittelten gegen den Tumor gerichteten Immunreaktionen in vitro, so erweisen sie sich als ausgesprochen variabel. Sowohl die T-Lymphozyten, als auch die übrigen Lymphozyten waren in einem Mikrozytotoxizitätstest während der frühen Phasen des Tumorwachstums zytotoxisch gegenüber Sarkom-Zellen. Nach Tumorregression verschwand die durch T-Lymphozyten vermittelte Zytotoxizität; die übrigen Lymphozyten blieben über den 30. Tag hinaus zytotoxisch. In den Seren der Regressor-Tiere konnten keine spezifischen Antikörper festgestellt werden.

In unseren Versuchen untersuchten wir die Immunität gegenüber einem

durch MCA induzierten Tumor nach der Transplantation von 10^5 syngenem MCAF-Zellen. Die Tumoren wuchsen progredient bis zum Tode des Wirtes nach 35 bis 40 Tagen. Wurden weniger als 5×10^4 Zellen den syngenem Tieren übertragen, war Tumorstadium bei etwa 50 % der beimpften Mäuse zu beobachten.

In unserer Verlaufsstudie konnte eine durch Lymphozyten vermittelte Zytotoxizität in nicht vorimmunisierten, tumortragenden Mäusen 7 Tage nach der Transplantation von syngenem MCAF-Zellen gezeigt werden. Die Zytotoxizität erreichte ihren Höhepunkt nach 14 Tagen, danach nahm sie ab und war nach 35 Tagen verschwunden. Diese Zeitabhängigkeit wurde bei unfractionierten Milzzellen ebenso beobachtet wie bei gereinigten T-Zellen. Die T-Zellen, die in diesen Versuchen verwendet wurden, machten mehr als 90 Prozent der Zellen aus, wie die Behandlung mit Anti-O-Serum und Komplement zeigte. Während EAC-Rezeptoren tragende Zellen fast vollständig verschwanden, waren Fc-Rezeptoren tragende Zellen in wechselnder Menge festzustellen. Die Behauptung, daß die T-Zellen für die beobachtete Wirkung verantwortlich sind, muß mit der Einschränkung betrachtet werden, daß unsere gereinigten T-Zellen auch einen geringen Anteil anderer Zellen, einschließlich K-Zellen enthielten.

Die adhärenz Zellen wiesen ein entsprechendes zeitabhängiges Verhalten der zytotoxischen Aktivität auf. Im Gegensatz zu den T-Zellen tumortragender Mäuse, die höchstens eine 30 %ige Freisetzung der Radioaktivität aus den Target-Zellen im zytotoxischen Versuch hervorriefen, waren sogar die adhärenz Zellen der nicht tumortragenden

Mäuse hoch zytotoxisch; bis zu 40 % der cpm_{max} wurde im Überstand nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden im Falle der adhärenenten Zellen gemessen.

Die adhärenenten Zellen, die aus Peritonealzellen isoliert wurden, sind eine Mischung aus phagozytierenden Zellen und Lymphozyten, die auf der Oberflächenmembran Immunglobulin und Fc-Rezeptoren tragen; aber auch einige T-Zellen und andere nicht identifizierte Zellen (weniger als 10 %) können darunter sein. Das Serum tumortragender Mäuse hat keinen Einfluß auf die Zytotoxizität der T-Zellen. Der zeitliche Verlauf der Lymphozytotoxizität in Gegenwart oder Abwesenheit von Serum ist identisch. Die Zytotoxizität der adhärenenten Zellen nimmt jedoch in Gegenwart von Serum tumortragender Mäuse zu. Serumfaktoren aktivieren die Zytotoxizität zweifellos 7 Tage nach Tumortransplantation. Die Zytotoxizität der adhärenenten Zellen konnte länger als 35 Tage nach Tumورverpflanzung gezeigt werden, wenn Serum dem zytotoxischen Test zugegeben wurde.

Die Abnahme der zytotoxischen Aktivität ist möglicherweise der hemmenden Wirkung von Antigen- oder Antigen-Antikörper-Komplexen zuzuschreiben, die im Serum von Tumorträgern 2 - 3 Wochen nach der Transplantation von Tumorzellen vorhanden sind. Diese Vorstellung wird durch die Tatsache unterstützt, daß nach 35 Tagen aus Tumorträgern gewonnenes Serum fähig ist, die Zytotoxizität von Lymphozyten aus Mäusen 14 Tage nach Tumortransplantation zu verhindern. Aus Ergebnissen von Versuchen, bei denen Lymphozyten mit Membranproteinzubereitungen aus MCAF-Zellen (35) vorinkubiert wurden, kann man schlie-

Ben, daß das hemmende Material ein zirkulierendes Antigen ist, welches von den wachsenden Tumoren ausgeschüttet wird. Jedoch können andere hemmende Mechanismen wie zum Beispiel die Entwicklung von Memory-T-Zellen oder von Suppressor-T-Zellen während des Tumorstwachstums auch beteiligt sein.

Nach Immunisierung der Mäuse mit erhitzten Tumorzellen zeigten etwa 30 % der Wirte eine Regression des Tumors; in den anderen Tieren war das Tumorstwachstum im Vergleich zu den nicht immunisierten Mäusen für etwa 14 Tage signifikant zurückgeblieben.

Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen zeigte sich in den immunisierten Mäusen bereits vor der Transplantation von Tumorzellen. Bei den immunisierten Tieren erreicht die Lymphozytotoxizität ihren Gipfel zwischen dem 21. und 28. Tag nach Tumortransplantation. Die Zytotoxizität war in den immunisierten Tieren nach 35 Tagen vermindert, besonders in den Mäusen, die eine Retardierung des Tumorstwachstums zeigten. In den Regressortieren war eine geringere aber deutliche Zytotoxizität nach 35 Tagen vorhanden. Die bemerkenswerteste Entdeckung war die hohe Zytotoxizität der adhärenenten Zellen, die vom Zeitpunkt der Transplantation bis 28 Tage danach gezeigt werden konnte. Diese zunehmende Aktivität der adhärenenten Zellen scheint durch Serumfaktoren verursacht zu sein, die in den immunisierten Tieren gebildet wurden und die Makrophagen in vivo aktivieren. Dieser Schluß kann aus den Werten gezogen werden, die mit Lymphozyten aus tumortragenden Mäusen in der Gegenwart von Serum erhalten wurden. Über den Immunisierungsvorgang mit Freund'schen Adjuvans (FA) ist bekannt, daß es damit möglich ist, besonders zirkulierende Antikörper zu produzieren. Aber es kann

ebenso diskutiert werden, daß die angestiegene Zytotoxizität der adherenten Zellen mit dem specific macrophage arming factor (SMAF), der in der Literatur beschrieben ist, in Beziehung steht (10, 11, 14).

Dieser SMAF rüstet die Makrophagen nach Kontakt mit dem spezifischen Antigen aus und macht sie spezifisch zytotoxisch gegen Target-Zellen. Es ist angenommen worden, daß der SMAF der lösliche spezifische Rezeptor der T-Zellen sein könnte.

Die Ergebnisse unserer Arbeit untermauern die Vorstellung, daß bei der Überwachung des Tumorstwachstums verschiedene Mechanismen während der Tumorkrankheit interferieren. In den ersten 3 Wochen nach der Tumortransplantation scheinen die T-Zell-abhängigen Immunprozesse am wichtigsten zu sein. Die T-Zellen-Aktivität schließt sowohl die direkte Zytotoxizität der T-Zellen, als auch die Aktivierung der Makrophagen durch von T-Zellen gebildeten Mittlersubstanzen ein. Danach verschwinden aus unbekannten Gründen die T-Zellen vermittelten Immunreaktionen in den Progressor-Tieren wie auch in den Regressor-Tieren. Nach unseren Resultaten sind nur die durch Serum vermittelten Abwehrmechanismen 5 Wochen nach der Tumortransplantation feststellbar. Diese Serumfaktoren, wie z.B. zytophile Antikörper, können Makrophagen aktivieren; eine signifikante Wirkung von nicht-T-Zell-abhängiger durch Antikörper vermittelter Zytotoxizität konnte in unseren Versuchen nicht gezeigt werden.

Zusammenfassung:

In der vorliegenden Arbeit wurde die in vitro gemessene Lymphozytotoxizität mit dem Tumorstadium in vivo verglichen. Als Tumor verwendeten wir ein syngenes, transplantierbares, durch Methylnanthren (MCA) induziertes Fibrosarkom von C57Bl6 Mäusen. Es wuchs bis zum Tode der Mäuse nach 40 - 45 Tagen progredient. Die Zytotoxizität der Milzzellen, der gereinigten T-Zellen und der adhärenz Zellen, die aus Peritonealexsudat-Zellen gewonnen wurden, zeigten eine reproduzierbare Kinetik der Immunantwort gegenüber MCAF-Zellen. 7 - 14 Tage nach der Tumortransplantation konnte bei den tumortragenden Mäusen eine Zytotoxizität aller Lymphozytenpopulationen aufgezeigt werden. Sie verringerte sich nach 21 Tagen und verschwand nach 35 Tagen vollständig. Serumfaktoren erhöhten die Zytotoxizität der adhärenz Zellen bei tumortragenden Mäusen vom 7. bis zum 35. Tag nach Tumortransplantation. Bei Mäusen, die mit durch Hitze abgetöteten MCAF-Zellen vorimmunisiert waren, zeigte ein Drittel der transplantierten Tumoren vollständige Regression, bei den übrigen wurde eine signifikante Retardierung des Tumorstadiums beobachtet. Auch hier hing die Lymphozytotoxizität vom Stadium des Tumorstadiums ab. In vitro Zytotoxizität wurde vor und bis zum 28. Tag nach Tumortransplantation festgestellt. Später verschwand die Zytotoxizität sowohl in den Regressor-Tieren als auch in den Tieren mit verzögertem Tumorstadium. In den immunisierten Tieren war die hohe Zytotoxizität der adhärenz Zellen am bemerkenswertesten. Die Kinetik der Zytotoxizität

der adhären ten Zellen stand offensichtlich in Beziehung zu denen der T-Zellen. Über den 35. Tag nach Transplantation hinaus konnte eine Zytotoxizität der adhären ten Zellen nur in Gegenwart von Serum gezeigt werden. Es muß erörtert werden, daß verschiedene Immunmechanismen mit dem Tumorwachstum interferieren, was durch in vitro Zytotoxizitätsteste zu verschiedenen Zeitpunkten nach Tumortransplantation festgestellt werden kann.

Literaturverzeichnis:
=====

1. Baldwin, R.W.
Immunological aspects of chemical carcinogenesis.
Adv. Cancer Res. 18 , 1 (1973)
2. Baldwin, R.W. and Embleton, M.J.
Demonstration by colony inhibition methods of cellular and humoral reactions to tumor specific antigens associated with aminoazo dye-induced rat hepatomas.
Int. J. Cancer 7 , 17 (1971)
3. Baldwin, R.W. and Embleton, M.J.
Neoantigens on spontaneous and carcinogen-induced rat tumors defined by in vitro lymphocytotoxicity assay.
Int. J. Cancer 13 , 433 (1974)
4. Barski, G. and Youn, J.K.
Evolution of cell-mediated immunity in mice bearing an antigenic tumor. Influence of tumor growth and surgical removal.
J. Natl. Cancer Inst. 43 , 111 (1969)
5. Bennett, B., Old, L.J. and Boyse, E.A.
The phagocytosis of tumor cells in vitro.
Transplantation 2 , 183 (1964)

6. Chambers, V.C. and Weiser, R.S.
An electron microscope study of the cytophagocytosis of sarcoma I cells by alloimmune macrophages in vitro.
J. Natl. Cancer Inst. 51 , 1369 (1973)
7. Cohen, A.M., Millar, R.C. and Detcham, A.S.
A microassay for cytotoxic antibody using ^{125}J -Iododeoxyuridine-labeled target-cells.
Transplantation 13 , 57 (1972)
8. Cruse, J.M., Whitten, H.D., Lewis, G.K. et al.
Facilitation of macrophage-mediated destruction of allogeneic fibrosarcoma cells by tumor enhancing IgG₂ in vitro.
Transplant. Proc. 5 , 961 (1973)
9. Evans, R.
Macrophages and the tumor bearing host.
Br. J. Cancer 28 , (suppl. I) 19 (1973)
10. Evans, R. and Alexander, P.
Role of macrophages in tumor immunity. I. Cooperation between macrophages and lymphoid cells in syngeneic tumor immunity.
Immunology 23 , 615 (1972)
11. Evans, R., Cox, H. and Alexander, P.
Immunologically specific activation of macrophages armed with the specific macrophage armin factor (SMAF).
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 143 , 256 (1973)

12. Globerson, A. and Feldman, M.
Antigenic specificity of benzo (a) pyrene - induced sarcomas.
J. Natl. Cancer Inst. 32 , 1229 (1964)
13. Granger, G.A. and Weiser, R.S.
Homograft target cells: contact destruction in vitro by immune
macrophages.
Science 151 , 97 (1966)
14. Grant, C.K., Currie, G.A. and Alexander P.
Tymocytes from mice immunized against an allograft render bone
marrow cells specifically cytotoxic.
J. Exp. Med. 135 , 150 (1972)
15. Halliday, W.J. and Webb, M.
Delayed hypersensitivity to chemically induced tumors in mice
and correlation with an in vitro test.
J. Natl. Cancer Inst. 43 , 141 (1969)
16. Harris, J.E. and Sinkovics, J.G.
Immunology of malignant diseases.
C.V. Mosby Co. St. Louis 1976
17. Hellström, I. and Hellström, K.E.
Colony inhibition studies on blocking and non-blocking serum
effects on cellular immunity to Moloney sarcomas.
Int. J. Cancer 13 , 195 (1970)

18. Hellström, I., Hellström, K.E. and Pierce, G.E.
In vitro studies of immune reactions against autochthonous and syngeneic mouse tumors induced by methylcholanthrene and plastic discs.
Int. J. Cancer 3 , 107 (1968)
19. Heppner, G.H.
In vitro studies on cell-mediated immunity following surgery in mice sensitized to syngeneic mammary tumors.
Int. J. Cancer 9 , 119 (1972)
20. Herberman, R.B.
Cell-mediated immunity to tumor cells.
Adv. Cancer Res. 19 , 107 (1974)
21. Hibbs, J.B., Jr.
Macrophage non immunologic recognition: target cell factors related to contact inhibition.
Science 180 , 868 (1973)
22. Julius, M.H., Simpson, E. and Herzberg, L.A.
A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes.
Eur. J. Immunol. 3 , 645 (1973)

23. Kirchner, H., Chused, T.M. and Herberman, R.B.
Evidence of suppressor cell activity in spleens of mice bearing
primary tumors induced by Moloney sarcoma virus.
J. Exp. Med. 139 , 1473 (1974)
24. Klein, Sjögren, H.O. and Klein, E.
Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced
sarcomas in the primary autochthonous host.
Cancer Res. 20 , 1561 (1960)
25. Krahenbuhl, J.L. and Remington, J.S.
The role of macrophages in specific and nonspecific cytostasis
of tumor cells.
J. Immunol. 113 , 507 (1974)
26. Lamont, E.W., Anderson, B., Wigzell, H. et al.
The immune response to primary Moloney sarcoma virus tumors in
Balb/c mice: cellular and humoral activity of long-term regressors.
Int. J. Cancer 13 , 91 (1974)
27. Lavrin, D.H., Herberman, R.B. and Nunn, M. et al.
In vitro cytotoxicity studies of murine sarcoma virus induced
immunity in mice.
J. Natl. Cancer Inst. 51 , 1497 (1973)
28. Oren, M.E., Herberman, R.B. and Canty, T.G.
Immune response to Gross virus-induced lymphoma.
III. Kinetics of the cellular response.
J. Natl. Cancer Inst. 46 , 621 (1971)

29. Ortiz de Landazuri, M. and Herberman, R.B.
Immune response to Gross virus-induced lymphoma.
III. Characteristics of the cellular immune response.
J. Natl. Cancer Inst. 49 , 147 (1972)
30. Prehn, R.T. and Main, J.M.
Immunity to methylcholanthren-induced sarcomas.
J. Natl. Cancer Inst. 18 , 769 (1957)
31. Tsoi, M. and Weiser, R.S.
Mechanism of immunity to sarcoma I allografts in the C57Bl/Ks mouse. III. The additive and synergistic actions of macrophages and immune serum.
J. Natl. Cancer Inst. 40 , 37 (1968)
32. Van Loveren, H. and Den Otter, W.
Macrophages in solid tumors. I. Immunologically specific effector cells.
J. Natl. Cancer Inst. 53 , 1057 (1974)
33. Wahl, D.V., Chapman, W.H. and Hellström, I.
Transplantation immunity to individually unique antigens of chemically induced tumors in mice.
Int. J. Cancer 14 , 114 (1974)
34. Warnatz, H.
Tumorimmunologie.
G.Thieme Verlag Stuttgart (1975)

35. Warnatz, H. and Koops, A.C.

Studies on the specificity of in vitro induced lymphocytotoxicity
to MCAF cell lines.

submitted for publication

36. Warnatz, H., Scheiffarth, F. and Zenker, W.

Comparative studies on the reactivity of T-cells and non-T-cells
in lymphocyte transformation experiments and cytotoxicity tests.

Cell. Immunol. 17 , 517 (1975)

Herrn Professor Dr. F. Scheiffarth danke ich für die
Überlassung des Themas.

Mein Dank gilt ganz besonders Herrn Professor Dr. H.
Warnatz für die freundliche Unterstützung bei der Ge-
staltung und Durchführung dieser Arbeit.

Sehr bedanke ich mich auch bei Frau H. Leowald und Herrn
E. Rückert für ihre Hilfsbereitschaft und tatkräftige
Mitarbeit.

L E B E N S L A U F

Am 7. Juni 1950 wurde ich als drittes Kind des Dr. jur. Kurt Meißner und seiner Ehefrau Magdalene, geb. Delius in Erlangen geboren.

Dort besuchte ich von 1956 bis 1960 eine Grundschule und von 1960 bis 1969 das Städt. Marie-Therese-Gymnasium, an dem ich im Juni 1969 die Reifeprüfung ablegte.

Vom Wintersemester 1969 bis zum Sommersemester 1970 war ich an der Universität Erlangen-Nürnberg für das Studienfach Rechtswissenschaften immatrikuliert. Ab Wintersemester 1970 bis zum Wintersemester 1971 studierte ich an der Universität Tübingen zunächst in einem Semester Biologie, sowie in den zwei folgenden zusätzlich auch Medizin und bestand anschließend die naturwissenschaftliche Vorprüfung. Die weitere Studienzeit verbrachte ich wieder an der Universität Erlangen-Nürnberg, an der ich auch im August 1973 die ärztliche Vorprüfung und im Januar 1977 die ärztliche Prüfung ablegte.

Buchdruck - Offsetdruck

Karl Döres, 852 Erlangen, Jägerstr. 3 · Tel. 2 15 21